

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan pada hewan uji tikus putih yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT 4) Universitas Gadjah Mada. Kandang dan pakan disediakan langsung oleh pengurus LPPT 4. Suhu ruangan laboratorium dikondisikan agar tetap pada suhu kamar (25°C) menggunakan *air conditioner* dan *exhaust fan*. Cara pemeliharaan tikus setiap kelompok disatukan kandangnya, sehingga setiap 1 kandang berisi 5 ekor tikus. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Pencahayaan terang 12 jam gelap 12 jam.

1. Laporan Proses Induksi *Streptozotocin* Menjadikan Tikus Diabetik

Keberhasilan induksi *streptozotocin* pada hewan uji dinilai dari kenaikan kadar Gula Darah Puasa yang menjadi indikator keadaan diabetik. Kadar GDP diamati dari sebelum dan sesudah induksi *streptozotocin* yang dapat dilihat pada Tabel 4.1.

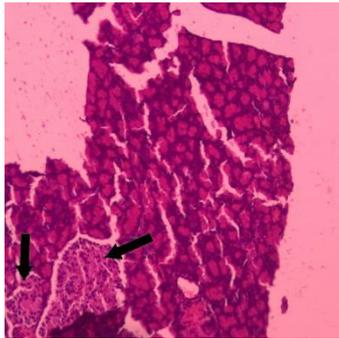
Tabel 4. 1. Kadar Glukosa Darah Puasa Tikus

No	Kelompok	N	Rerata GDP Sebelum \pm SD	Rerata GDP sesudah \pm SD
1	Kontrol Normal	5	65,04 \pm 7,23	-
2	Kelompok induksi STZ	24	72,96 \pm 9,91	330,99 \pm 55,08

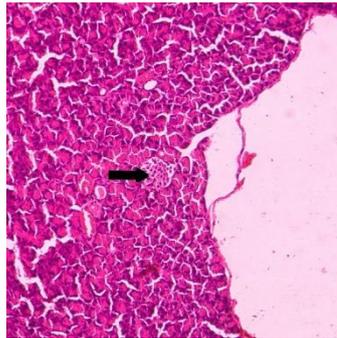
Kadar GDP sebelum dan sesudah induksi *streptozotocin* terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$), artinya induksi pada hewan uji menjadi keadaan hiperglikemik atau diabetik berhasil.

2. Gambaran Histopatologis Pulau *Langerhans* Pankreas

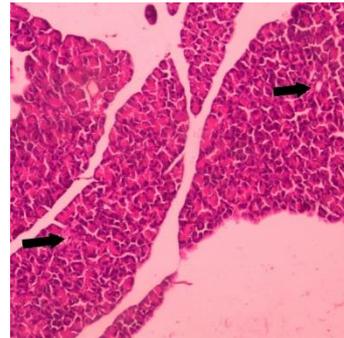
Gambaran histopatologis organ pankreas yang menunjukkan jumlah pulau *Langherhans* pada setiap kelompok dapat dilihat pada gambar di bawah.



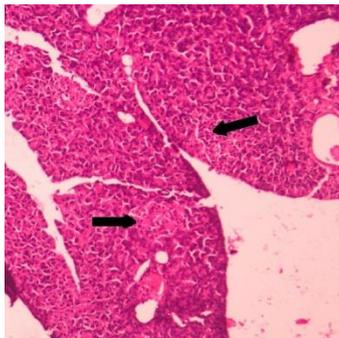
Gambar 1. Kontrol Normal (Jumlah)



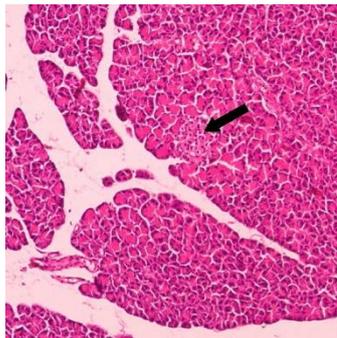
Gambar 3. Kontrol Positif (Jumlah)



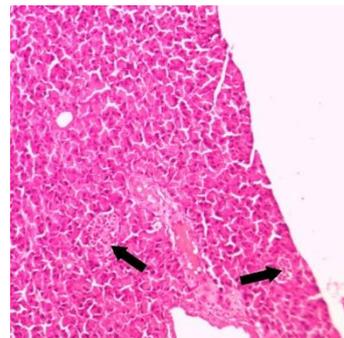
Gambar 5. DS 1mg/200grBB (Jumlah)



Gambar 2. Kontrol Negatif (Jumlah)

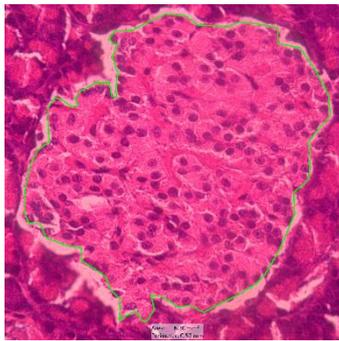


Gambar 4. DS 0,5mg/200grBB (Jumlah)

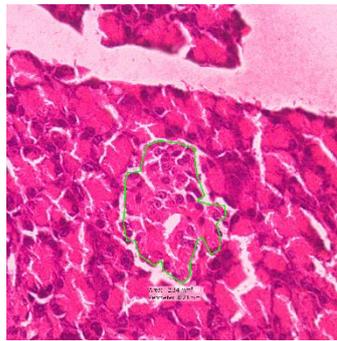


Gambar 6. DS 2mg/200grBB (Jumlah)

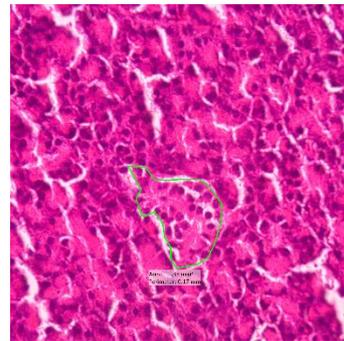
Gambaran histopatologis organ pankreas yang menunjukkan luas pulau *Langherhans* pada setiap kelompok dapat dilihat pada gambar di bawah.



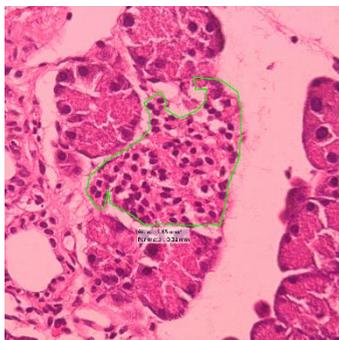
Gambar 7. Kontrol Normal (Luas)



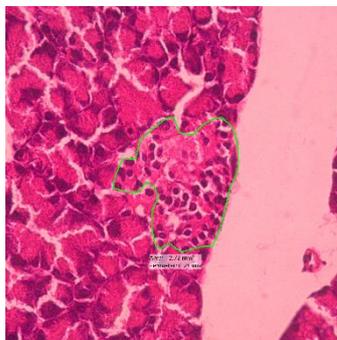
Gambar 9. Kontrol Negatif (Luas)



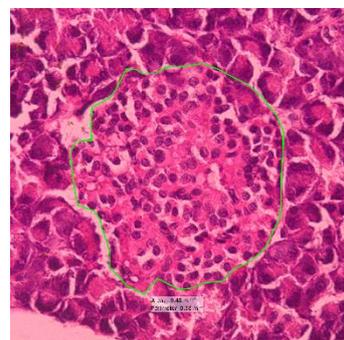
Gambar 11. Kontrol Positif (Luas)



Gambar 8. DS 0,5mg/200grBB (Luas)



Gambar 10. DS 1mg/200grBB (Luas)



Gambar 12. DS 2mg/200grBB (Luas)

3. Jumlah Pulau *Langherhans*

Pengecatan preparat dengan metode *Hematoxylin-Eosin* dilakukan untuk mengamati jumlah pulau *Langherhans*. Pengamatan jumlah pulau *Langherhans* pada satu sampel dihitung dengan cara mencari pulau *Langherhans* pankreas sebanyak 5 lapang pandang dari satu sediaan jaringan pankreas yang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Pulau *Langherhans* pankreas ditandai dan dijumlahkan setiap lapang pandang preparat. Rata-rata jumlah pulau *Langherhans* pankreas dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2. Rerata Jumlah Pulau Langerhans Pankreas Tikus

No	Kelompok	N	Rerata \pm SD
1	Kontrol Normal	5	$2 \pm 0,58^a$
2	Kontrol Negatif	4	$0,75 \pm 0,5^b$
3	Kontrol Positif (Glibenklamid)	4	$1 \pm 0,36^b$
4	DS 0,5mg/200grBB	3	$0,53 \pm 0,41^b$
5	DS 1mg/200grBB	2	$1,6 \pm 0,28^{ab}$
6	DS 2mg/200grBB	4	$1,5 \pm 0,11^a$

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf sama berarti tidak beda signifikan ($p > 0,05$)

Tabel 4.2 menunjukkan rata-rata jumlah pulau *Langherhans* pada perlakuan ekstrak DS 0,5mg/200grBB sangat sedikit dibanding dengan kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak DS 1mg/200grBB dan perlakuan DS 2mg/200grBB. Berdasarkan rerata jumlah pulau *Langherhans* pankreas dari yang tertinggi ke terendah secara berturut-turut adalah kontrol normal, perlakuan ekstrak DS 2mg/200grBB, perlakuan ekstrak DS 1mg/200grBB, kontrol positif, kontrol negatif dan perlakuan DS 0,5mg/200grBB.

Uji statistik data menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil *Kruskal-Wallis* memiliki nilai $p = 0,008$, dengan demikian $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan signifikan terhadap peningkatan jumlah pulau *Langherhans*. Data memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$, kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Mann-Whitney*.

Berdasarkan uji *Mann-Whitney* didapatkan hasil kontrol normal berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Perbedaan signifikan antara kontrol normal dengan kontrol negatif menunjukkan tikus yang diinduksi *streptozotocin* mengalami kerusakan pada pankreas dengan ditandai penurunan jumlah pulau *Langherhans* pankreas. Kontrol positif

tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif, hal ini menunjukkan terapi glibenklamid tidak mampu meningkatkan jumlah pulau *Langherhans* pankreas tikus. Kelompok perlakuan ekstrak *DS* 0,5mg/200grBB dan 1mg/200grBB keduanya tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif dan kontrol positif. Hal ini menandakan dosis ekstrak *DS* belum sesuai. Berbeda dengan kelompok perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB, perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan ekstrak *DS* 0,5mg/200grBB. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB mampu meminimalkan kerusakan pankreas yang ditunjukkan dengan jumlah pulau *Langherhans* pankreas lebih banyak daripada kontrol negatif.

4. Luas Pulau *Langherhans*

Pengecatan preparat dengan metode *Hematoxylin-Eosin* dilakukan untuk mengamati luas pulau *Langherhans*. Pengamatan luas pulau *Langherhans* pada satu sampel diukur dengan cara mencari pulau *Langherhans* pankreas sebanyak 5 pulau *Langherhans* dari satu sediaan jaringan pankreas yang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Pulau *Langherhans* pankreas ditandai dan diukur luasnya menggunakan aplikasi *ImageRaster*. Hasil dari pengukuran luas pulau *Langherhans* pankreas dijumlahkan dan dihitung rata-ratanya. Rata-rata luas pulau *Langherhans* pankreas dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4. 3. Rerata Luas Pulau Langerhans Pankreas Tikus

No	Kelompok	N	Rerata \pm SD (mm ³)
1	Kontrol Normal	5	6,96 \pm 2 ^a
2	Kontrol Negatif	4	3,14 \pm 1,6 ^{bc}
3	Kontrol Positif (Glibenklamid)	4	2,71 \pm 0,97 ^b
4	DS 0,5mg/200grBB	3	2,59 \pm 0,05 ^b
5	DS 1mg/200grBB	2	1,93 \pm 0,13 ^{ab}
6	DS 2mg/200grBB	4	6,17 \pm 3,08 ^{ac}

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf sama berarti tidak beda signifikan ($p > 0,05$)

Tabel 4.3 menunjukkan rata-rata luas pulau *Langherhans* pada perlakuan ekstrak DS 1mg/200grBB sangat kecil dibanding dengan kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak DS 0,5mg/200grBB dan perlakuan ekstrak DS 2mg/200grBB. Berdasarkan rerata jumlah pulau *Langherhans* pankreas dari yang tertinggi ke terendah secara berturut-turut adalah kontrol normal, perlakuan ekstrak DS 2mg/200grBB, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak DS 0,5mg/200grBB dan perlakuan ekstrak DS 1mg/200grBB.

Uji statistik data menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* memiliki nilai $p = 0,013$, dengan demikian $p < 0,05$, maka terdapat perbedaan signifikan terhadap peningkatan luas pulau *Langherhans* pankreas. Data memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$, kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Mann-Whitney*.

Berdasarkan uji *Mann-Whitney* didapatkan hasil kontrol normal berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Perbedaan signifikan antara kontrol normal dengan kontrol negatif menunjukkan tikus yang diinduksi *streptozotocin* mengalami kerusakan pada pankreas dengan ditandai pengecilan luas pulau *Langherhans* pankreas. Kontrol positif

tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif, hal ini menunjukkan terapi glibenklamid tidak mampu meminimalkan kerusakan pankreas tikus. Kelompok perlakuan ekstrak *DS* 0,5mg/200grBB dan *DS* 1mg/200grBB keduanya tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif dan kontrol positif. Hal ini menandakan dosis ekstrak *DS* belum sesuai. Berbeda dengan kelompok perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB, perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif dan perlakuan ekstrak *DS* dosis 0,5mg/200grBB. Namun, perlakuan *DS* 2mg/200grBB tidak berbeda signifikan terhadap kontrol negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB belum mampu meminimalkan kerusakan pankreas dari segi luas pulau *Langherhans* secara statistik.

B. Pembahasan

Jumlah dan luas pulau *Langherhans* kelompok normal dengan rata-rata $2 \pm 0,58$ dan $6,96 \pm 2$ berbeda signifikan terhadap kelompok negatif dengan rata-rata $0,84 \pm 0,47$ dan $2,81 \pm 1,57$. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Andayani bahwa tikus diabetik mengalami penurunan jumlah dan luas pulau *Langherhans*. Hal ini disebabkan oleh mekanisme *Streptozotocin* yang menginduksi tikus menjadi diabetes dengan merusak secara selektif sel beta pankreas hingga menyebabkan defisiensi insulin, sehingga terjadi hiperglikemia dengan gejala polidipsia (banyak minum), poliuria (banyak buang air kecil) dan polipagi dimana gejala-gejala tersebut menyerupai diabetes tipe 1 pada manusia (Kolb, 1987). Injeksi *STZ* sebesar

60mg/kg intravena atau intraperitoneal pada tikus dapat menyebabkan degenerasi sel *beta Langherhans* dan secara klinik menunjukkan tanda diabetes pada hari ke 4-6 (Szkuldelski, 2001). *STZ* menghambat sekresi insulin dan menyebabkan peningkatan *insulin-dependent* diabetes melitus. Kedua efek tersebut dapat dihubungkan dengan zat kimia tertentu, terutama potensi *alkylating*. *STZ* analog dengan *nitrosourea*, yaitu *N-methyl-N-nitrosourea (MNU)* berikatan dengan karbon-2 dari *hexose*. Toksisitas *STZ* dan senyawa *alkylating* yang berhubungan secara kimia masuk ke dalam sel. *STZ* secara selektif terakumulasi di dalam sel *beta* pankreas melalui *glukosa transporter 2 (GLUT2)* dengan afinitas rendah dalam membran plasma. Toksisitas *STZ* lebih besar dibanding dengan *N-methyl-N-nitrosourea* dalam sel menggunakan *GLUT2*, meskipun kedua substansi mempunyai kemiripan DNA. Kepentingan *glukosa transporter 2 (GLUT2)* dalam proses ini ditunjukkan pada adanya pengamatan bahwa *STZ* merusak organ lain yang menggunakan transporter ini, khususnya ginjal dan hati. Toksisitas *STZ* terikat terhadap aktivitas *alkylating DNA methyl nitrosourea moiety*, terutama pada posisi O⁶ guanin. Perpindahan kelompok metil dari *STZ* ke molekul DNA menyebabkan kerusakan sel karena fragmentasi DNA. Glikosilasi protein mungkin menjadi faktor kerusakan tambahan (Szkuldelski, 2001).

Kelompok positif memiliki rata-rata jumlah pulau *Langherhans* $1 \pm 0,36$ dan luas pulau *Langherhans* $2,71 \pm 0,97$. Kelompok negatif memiliki rata-rata jumlah pulau *Langherhans* $0,84 \pm 0,47$ dan luas pulau *Langherhans* $2,81 \pm 1,57$. Hal ini menunjukkan kelompok kontrol positif memiliki jumlah dan

luas pulau *Langherhans* pankreas yang tidak berbeda signifikan terhadap kontrol negatif hingga cenderung lebih buruk. Hal tersebut bisa disebabkan oleh mekanisme glibenklamid yang hanya merangsang sekresi insulin sehingga terjadi penurunan jumlah dan luas pulau *Langherhans* (Murray., *et al*, 2003). Glibenklamid menstimulasi sel-sel beta dari pulau *Langherhans* pankreas sehingga sekresi insulin ditingkatkan. Selain itu, kepekaan sel-sel beta bagi kadar glukosa darah juga diperbesar melalui pengaruhnya atas protein transport glukosa. Glibenklamid merupakan obat anti-diabetika oral golongan *sulfonilurea*, berbentuk tablet dengan tiap tablet mengandung glibenklamid 5mg. Obat-obat antidiabetika oral tidak mengandung insulin tetapi merangsang pankreas untuk menghasilkan lebih banyak insulin atau membantu sel untuk menggunakan insulin yang tersedia dengan lebih maksimal (Tjay & Rahardja, 2002).

Kelompok ekstrak *DS* 0,5mg/200grBB, 1mg/200grBB dan 2mg/200grBB masing-masing memiliki jumlah pulau *Langherhans* $0,53 \pm 0,41$; $1,6 \pm 0,28$; $1,5 \pm 0,11$ dan luas pulau *Langherhans* $2,59 \pm 0,05$; $1,93 \pm 0,13$; $6,17 \pm 3,08$. Kelompok negatif memiliki rata-rata jumlah pulau *Langherhans* $0,84 \pm 0,47$ dan luas pulau *Langherhans* $2,81 \pm 1,57$. Hal ini menunjukkan tidak semua kelompok ekstrak *DS* memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok negatif. Kelompok perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB memiliki khasiat yang lebih baik dibandingkan kelompok ekstrak *DS* 0,5mg/200grBB dan 1mg/200grBB.

Jumlah pulau *Langherhans* kelompok perlakuan ekstrak *DS* 2mg/200grBB dengan nilai rata-rata $1,5 \pm 0,11$ berbeda signifikan dengan kelompok negatif dengan nilai rata-rata $0,84 \pm 0,47$. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Widowati tahun 2007, yaitu jumlah pulau *Langherhans* lebih banyak ditemukan pada kelompok perlakuan ekstrak teh hijau dalam pembuatan beras fungsional dibandingkan kelompok tikus diabetik. Hal ini bisa disebabkan oleh peran dari *antioxidant* yang terkandung pada ekstrak *DS*. *Antioxidant* dapat membentuk mekanisme pertahanan sel terhadap kerusakan radikal bebas. Enzim antioksidan merupakan bagian utama dari mekanisme pertahanan ini. Superoksida dismutasi (SOD) dapat melawan radikal peroksida, terutama hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan cara mengubahnya menjadi H_2O . H_2O_2 merupakan generator radikal bebas yang poten dan dapat menimbulkan racun radikal hidroksil dengan cara bereaksi bersama ion *ferro* yang kemudian dapat menginduksi terjadinya peroksidasi lipid membran sel (Slater, 1984). Radikal bebas, seperti superoksida dan radikal hidroksil, menyebarkan efek racun mereka dengan cara beraksi pada DNA, membran protein dan lipid (Dumontet., *et al*, 2001). *Phytochemical poliphenol* yang ditemukan pada ekstrak *DS* juga dapat memengaruhi ekspresi gen yang relevan untuk perjalanan penyakit diabetes, yaitu gen yang mengatur transportasi glukosa, sekresi atau aksi insulin, efek antioksidan, peradangan, fungsi pembuluh darah, metabolisme lipid, termogenik atau mungkin mekanisme lainnya. Efek ini telah dipelajari menggunakan *in vitro*, hewan dan manusia *ex vivo* model dari otot dan adiposa

jaringan serta analisis mRNA dari PBMC manusia (Dembinska-Kiec, *et al.*, 2008).

Luas pulau *Langherhans* kelompok perlakuan ekstrak DS 2mg/200grBB dengan nilai rata-rata $6,17 \pm 3,08$ tidak berbeda signifikan dengan kelompok negatif dengan nilai rata-rata $2,81 \pm 1,57$. Hasil tersebut ternyata sama dengan yang telah dilakukan oleh Julianti *et al* tahun 2015, yaitu luas pulau *Langherhans* baik pada tikus yang diberi pakan pati tapioka alami maupun tapioka termodifikasi ekstrak teh hijau tidak memiliki perbedaan signifikan. Hasil tersebut tidak menunjukkan bahwa semua kelompok tikus juga memiliki sekresi insulin yang sama. Ukuran pulau *Langerhans* belum bisa menunjukkan jumlah produksi dan sekresi insulin. Meskipun pulau *Langerhans* ukurannya besar, tetapi memiliki kemungkinan jumlah sel beta yang normal (tidak rusak) sangat sedikit sehingga produksi dan sekresi insulin akan mengalami penurunan yang signifikan (Widowati, 2007). Penilaian secara obyektif terhadap sekresi insulin lebih baik dengan cara menghitung jumlah sel beta pankreas dengan metode pengecatan *Chromalum Gomori* atau Imunohistokimia karena mampu menampilkan sel beta secara jelas (Widowati, 2007).

